

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293185

研究課題名(和文)新たに同定したアディポサイトカインによる心血管制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of the novel adipocytokine in regulation of cardiovascular disease

研究代表者

大内 乗有(Ouchi, Noriyuki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：00595514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、私たちが同定した新規アディポサイトカインであるアディポリンの心血管疾患における役割を解析した。アディポリン欠損マウスは対照マウスと比べて、虚血再灌流後の心筋梗塞巣サイズの増加、心収縮能の低下、心筋組織での炎症反応の増悪を認めた。アディポリンの心血管保護機序は、心筋細胞とマクロファージにおける炎症反応抑制と内皮細胞におけるアポトーシス反応抑制を介していることが明らかとなった。従って、アディポリンは心血管保護作用を有するアディポサイトカインであると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here we investigated the role of the novel adipokine adipolin in regulation of cardiovascular disease. We found that adipolin knockout mice had increased myocardial infarct size and reduced cardiac function following ischemia-reperfusion compared with control mice, which were accompanied by enhanced inflammatory response in ischemic heart. Furthermore, adipolin reduced inflammatory responses in cultured cardiac myocytes and macrophages, and attenuated endothelial cell apoptosis. Thus, adipolin can serve as a cardiovascular protective adipocytokine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子心臓病態学 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

我が国において、近年の生活習慣の変化に伴って、内臓脂肪蓄積を基盤とした糖尿病、高脂血症、高血圧を高率に合併するメタボリックシンドロームやその終末像ともいえる動脈硬化性の心血管病を代表とする生活習慣病は増加の一途をたどり、その病態解明及び治療法の確立は最重要課題である。しかし、肥満による心血管病の発症・進展機序は分子レベルにおいて十分には解明されていない。

近年の研究により、脂肪組織はアディポサイトカイン(あるいはアディポカイン)と総称すべき生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが示された。そして、申請者や他の研究グループの研究成果により、肥満状態におけるアディポサイトカインの産生異常が生活習慣病の病態に中心的役割を果たしていることが明らかとなってきた。

申請者らは、マウス脂肪組織の発現遺伝子のスクリーニングの過程で、アディポネクチンパラログの一つであり、機能が不明であった新規アディポサイトカイン「アディポリン(Adipolin/C1q-TNF-related protein 12)」を同定し、脂肪組織に高発現するアディポリンが肥満状態で低下する血中蛋白であること、アデノウイルス発現系を用いた検討により、アディポリンが脂肪組織での炎症性反応を抑制し、インスリン抵抗性を改善することを明らかにした。しかし、アディポリンの心血管病における役割については全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

我が国において、心血管疾患をはじめとする生活習慣病の病態解明と治療法の開発は急務である。本研究において、申請者らが同定した新規アディポサイトカインである「アディポリン」の心血管系制御機構を個体レベルで明らかにし、その分子機序を細胞レベルで解明する。さらに、ヒト心血管病におけるアディポリンの臨床的意義を明らかにする。つまり、アディポリンの機能解明により、アディポリンを新たな標的分子とした心血管疾患の病態生理解明と診断・治療応用へと展開していくことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 虚血性心疾患に対するアディポリンの作用の個体レベルでの評価

アディポリン欠損マウスの作成：常法により全身アディポリン欠損マウスを作成した。まず、生理的条件における心血管系に関する表現型を検討した。

心筋虚血再灌流モデル：マウスの左冠動脈前下行枝を60分間血流遮断後に再灌流し24時間後に心臓を摘出した。アディポリン欠損

マウスと対照である対照マウスに対して心筋虚血再灌流モデルを作成し、心筋虚血障害における内因性アディポリンの役割を検討した。

摘出心の形態学的、組織学的検討：Evans Blue/TTC染色を行い、左室エリア、虚血エリア、梗塞エリアを同定し、心筋梗塞サイズの定量化を行った。

心機能評価：心エコーを用いて、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室心筋壁厚、左室内径短縮率を評価した。

メカニズム解析：心筋組織における炎症性サイトカイン(TNF, IL-6, IL-1 β)の発現をReal-time PCR法にて定量評価した。

(2) 心筋細胞の炎症反応に対するアディポリンの作用の評価

ラット胎児から採取した心筋細胞を培養した。リコンビナントアディポリン蛋白を培養液中に前処理し、リポポリサッカライド(LPS)を添加後に炎症性サイトカイン(TNF, IL-6, IL-1 β)の発現をReal-time PCR法にて定量評価した。

(3) マクロファージの炎症反応に対するアディポリンの作用の評価

マウス腹腔マクロファージを用いた。リコンビナントアディポリン蛋白を培養液中に前処理し、リポポリサッカライド(LPS)を添加後に炎症性サイトカイン(TNF, IL-6)の発現をReal-time PCR法にて定量評価した。

(4) 内皮細胞機能に対するアディポリンの作用の評価

ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。リコンビナントアディポリン蛋白を培養液中に添加した。アポトーシスをTUNEL染色にて評価し、増殖能をBrdU取り込みにて評価した。

(5) 冠動脈疾患におけるアディポリンの測定意義の解析

健常者と冠動脈疾患患者の血中アディポリン濃度をELISA法にて測定した。

4. 研究成果

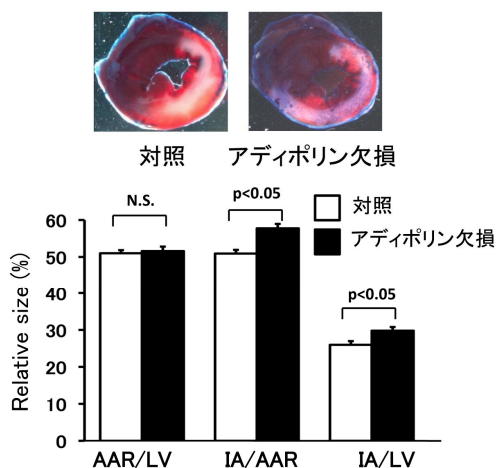
(1) アディポリンの急性心筋虚血障害に対する作用

アディポリン欠損マウスは対照マウスと比して、体重、摂食状態、脂肪や心臓を含めた臓器重量、血糖値などの糖代謝、脂質代謝や外観に変化は認めなかった。また、骨格筋での血管密度や血圧での検討においても、アディポリン欠損マウスと対照マウスに著差を認めず、非ストレス状態においては、心血管系に異常を認めないと考えられた。

アディポリン欠損マウスと対照マウスに心筋虚血再灌流モデルを作成した。アディポリン欠損マウスは対照マウスに比べ、心筋虚血再灌流後の心筋梗塞巣のサイズが有意に増加していた(図1)。従って、内因性アディポリンは急性心筋障害に対して保護的に作用する

ことが明らかとなった。

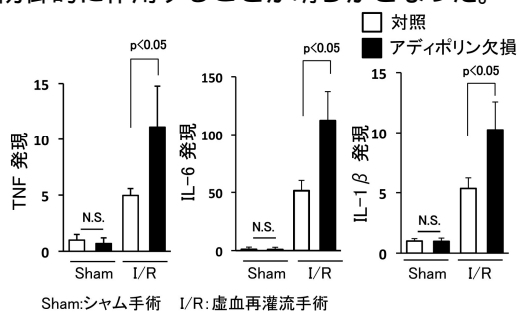
次に、心エコーにて心機能を評価した。心筋虚血再灌流後に対照マウスでは左室内径短縮率が低下するが、アディポリン欠損マウスにおいては対照マウスと比べて左室内径短縮率がより低下していた。



AAR: 虚血エリア, LV: 左室エリア, IA: 梗塞エリア

図1. マウス心筋虚血再灌流障害に対する内因性アディポリンの作用

心筋組織の炎症は虚血再灌流障害の進展に重要であるため、アディポリンの炎症反応に対する作用を虚血心筋での炎症性サイトカイン発現で検討した。アディポリン欠損マウスは対照マウスに比べ、虚血再灌流後の虚血心筋での TNF、IL-6 と IL-1 β の発現が有意に増加していた (図 2)。以上より、マウスにおいて内因性アディポリンは心筋組織での炎症に対して抑制的に働き、心筋虚血再灌流障害に防御的に作用することが明らかとなった。



Sham: シヤム手術 I/R: 虚血再灌流手術

図2. アディポリンのマウス心筋における炎症性サイトカイン発現に対する作用

(2) 培養心筋細胞におけるアディポリンの炎症抑制作用

アディポリンが心筋細胞の炎症性変化を制御するかを検討するために、培養心筋細胞をアディポリン蛋白前処理後に LPS 刺激を行った。LPS 刺激により TNF、IL-6 と IL-1 β の発現は著明に増加したが、アディポリン蛋白の前処理により有意に抑制された。従って、アディポリンは心筋細胞の炎症反応を抑制することが明らかとなった。

(3) 培養マクロファージにおけるアディポリンの炎症抑制作用

アディポリンがマクロファージの炎症反応を制御するかを検討するために、培養マウス腹腔マクロファージをアディポリン蛋白前処理後に LPS 刺激を行った。LPS 刺激により TNF、IL-6 と IL-1 β の発現は著明に増加したが、アディポリン蛋白の前処理により有意に抑制された。従って、アディポリンはマクロファージの炎症反応を抑制することが明らかとなった。

(4) 培養血管内皮細胞におけるアディポリンのアポトーシス抑制作用

アディポリンが内皮細胞機能を制御するかを検討するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞にアディポリン蛋白を添加した。アディポリンは無血清培地にて誘導されるアポトーシスを抑制した。また、アディポリンは内皮細胞の増殖を促進した。従って、アディポリンは内皮細胞に対して保護的に作用することが明らかとなった。

(5) 血中アディポリン濃度と冠動脈疾患

冠動脈疾患におけるアディポリンの測定意義の解析するために、冠動脈疾患患者と健常対照者の血中アディポリン濃度を測定した。冠動脈疾患患者の血中アディポリン濃度は対照者と比べて有意に低値を示した。従って、アディポリンの血中濃度は冠動脈疾患の有用な指標になりうる可能性が示唆された。

以上より、アディポリンは心筋細胞とマクロファージの炎症反応を抑制し、内皮細胞機能を促進することにより、心筋虚血障害に保護的に作用するアディポサイトカインであると考えられた。従って、アディポリンは心血管病の病態生理解明や治療法開発に結びつく標的分子となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- Kanemura N, Shibata R, Ohashi K, Ogawa H, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Otaka N, Murohara T, Ouchi N. C1q/TNF-related protein 1 prevents neointimal formation after arterial injury. *Atherosclerosis*. 2017;257:138-145. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.014. 査読有
- Harada K, Shibata R, Ouchi N, Tokuda Y, Funakubo H, Suzuki M, Kataoka T, Nagao T, Okumura S, Shinoda N, Kato B,

- Sakai S, Kato M, Marui N, Ishii H, Amano T, Matsubara T, Murohara T. Increased expression of the adipocytokine omentin in the epicardial adipose tissue of coronary artery disease patients. **Atherosclerosis**. 2016;251:299-304. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.003. 査読有
- Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Takahashi R, Otaka N, Ogawa H, Ito M, Kanemura N, Hiramatsu-Ito M, Ikeda N, Murohara T, Ouchi N. Association of circulating follistatin-like 1 levels with inflammatory and oxidative stress markers in healthy men. **PLoS One**. 2016;11:e0153619. doi: 10.1371/journal.pone. 査読有
- Hiramatsu-Ito M, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kanemura N, Kambara T, Enomoto T, Yuasa D, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Otaka N, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Omentin attenuates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. **Cardiovasc Res**. 2016;110:107-17. doi: 10.1093/cvr/cvv282. 査読有
- Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Mizutani N, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Kanemura N, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ogawa H, Murate T, Murohara T, Ouchi N. C1q/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart. **FASEB J**. 2016;30:1065-75. doi: 10.1096/fj.15-279885. 査読有
- Kambara T, Shibata R, Ohashi K, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Aprahamian T, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. C1q/TNF-related protein 9 protects against acute myocardial injury through an adipoR1-AMPK dependent mechanism. **Mol Cell Biol**. 2015;35:2173-85. doi: 10.1128/MCB.01518-14. 査読有
- Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K, Kambara T, Uemura Y, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Kanemura N, Ogawa H, Daida H, Murohara T, Ouchi N. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**. 2015;459:124-30. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.081. 査読有
- Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Kanemura N, Ito M, Ogawa H, Daida H, Murohara T, Ouchi N. Neuron-derived neurotrophic factor ameliorates adverse cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. **Circ Heart Fail**. 2015;8:342-51. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001647. 査読有
- Uemura Y, Shibata R, Kanemura N, Ohashi K, Kambara T, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Murohara T, Ouchi N. Adipose-derived protein omentin prevents neointimal formation after arterial injury. **FASEB J**. 2015;29:141-51. doi: 10.1096/fj.14-258129. 査読有
- Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Miyabe M, Enomoto T, Joki Y, Shimizu Y, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Ogawa H, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, van den Hoff MJ, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model. **J Am Soc Nephrol**. 2015;26:636-46. doi: 10.1681/ASN.2014020210. 査読有
- Matsuo K, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Joki Y, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic response. **J Mol Cell Cardiol**. 2015;79:195-202. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.11.019. 査読有
- Shibata R, Ohashi K, Murohara T, Ouchi N. The potential of adipokines as therapeutic agents for cardiovascular disease. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2014;25:483-7. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.005. 査読有
- Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Takeshita K, Kikuchi R, Takahashi R, Kataoka Y, Miyabe M, Joki Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ikeda N, Murohara T, Ouchi N. Association of

circulating C1q/TNF-related protein 1 levels with coronary artery disease in men. **PLoS One**. 2014;8:e99846. doi: 10.1371/journal.pone.0099846. 査読有

- ・ Kataoka Y, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Enomoto T, Uemura Y, Ogura Y, Yuasa D, Matsuo K, Nagata T, Oba T, Yasukawa H, Numaguchi Y, Sone T, Murohara T, Ouchi N. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMPK- and Akt-dependent mechanisms. **J Am Coll Cardiol**. 2014;63:2722-33. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.032. 査読有

[学会発表](計6件)

- ・ 大内乗有、大橋浩二、室原豊明 アディポサイトカイン「オメンチン」の心血管病における役割 第37回日本肥満学会 2016年10月7日～8日 東京ファッションタウン(東京都江東区)
- ・ Ouchi N. Molecular link between obesity and cardiovascular disease. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases 2016年7月12日～14日 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- ・ Ouchi N. Role of follistatin-like 1 as a myokine in cardiovascular disease. The 4th International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis. 2015年9月11日～12日 Seoul (Korea)
- ・ 大内乗有 A novel adipocytokine omentin and cardiovascular disease. 第47回日本動脈硬化学会総会学術集会 2015年7月9日～10日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
- ・ 大内乗有、大橋浩二、柴田玲、室原豊明 アディポサイトカインと血管疾患 脳心血管抗加齢研究会2014 2014年12月6日～7日 梅田スカイビル(大阪市北区)
- ・ Ouchi N. Role of adipocytokines in cardiovascular complication. 2014 International Conference on Diabetes and Metabolism. 2014年10月16日～18日 Gyeonggido (Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, Noriyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 00595514

(2) 研究分担者

大橋 浩二 (OHASHI, Koji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師
研究者番号: 10595515

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号: 70343689

室原 豊明 (MUROHARA, Toyooki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503